

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
11. März 2004 (11.03.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/021007 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: G01N 33/573

(30) Angaben zur Priorität:

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2003/002864

202 13 551.9 29. August 2002 (29.08.2002) DE
103 14 404.8 28. März 2003 (28.03.2003) DE

(22) Internationales Anmeldedatum:

27. August 2003 (27.08.2003)

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): INVITEK GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGIE & BIODESIGN MBH [DE/DE]; Robert-Rössle-Str. 10, 13125 Berlin (DE).

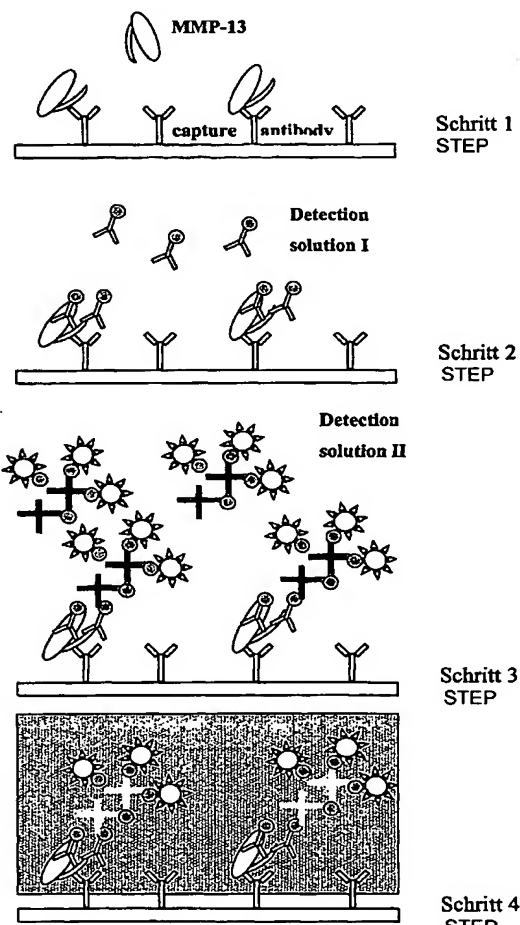
(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: ELISA KITS FOR DETECTING COLLAGENASE 3 AS A PROENZYME AND IN AN ACTIVATED FORM IN BODY FLUIDS AND CELL CULTURE SUPERNATANTS

(54) Bezeichnung: ELISA-KITS ZUM NACHWEIS VON KOLLAGENASE 3 ALS PROENZYM UND IN AKTIVIERTER FORM IN KÖRPERFLÜSSIGKEITEN UND ZELLKULTURÜBERSTÄNDEN



(57) Abstract: The invention relates to ELISA kits for detecting pro-collagenase 3 and activated collagenase 3 in body fluids, especially in human serum and synovial fluid, and in cell culture supernatants, and monoclonal antibodies which specifically recognise said antigens. Said ELISA kit comprises the following separately packed elements: a) a solid carrier comprising monoclonal antibodies which are bound thereto and sensitively and specifically bind human procollagenase 3 or activated collagenase 3; b) human recombinant procollagenase 3 or activated collagenase 3 as a standard for the quantitative determination of said enzyme; c) a buffer for producing a standard series of the recombinant collagenase 3; d) a buffer for diluting the body fluids to be analysed; e) a conjugate which is marked in such a way that it can be detected and which binds to collagenase 3; and f) a substrate which enables the visualisation of said conjugate which is marked in such a way that it can be detected. The monoclonal antibodies cited in a) are preferably monoclonal antibodies which are formed from the hybridoma with the deposit number DSM ACC 2572. Said ELISA kit can be used in medical fields, especially for controlling the development of rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus and tumour diseases.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ELISA-Kits zum Nachweis von Prokollagenase 3 und aktivierter Kollagenase 3 in Körperflüssigkeiten, insbesondere in Serum und Gelenkflüssigkeit des Menschen sowie in Zellkulturüberständen, und monoklonale Antikörper, die diese Antigene spezifisch erkennen. Der ELISA-Kit umfaßt in separater Verpackung wenigstens: a) einen festen Träger mit daran gebundenen monoklonalen Antikörpern, die sensitiv und spezifisch humane Prokollagenase 3 oder aktivierte Kollagenase 3 binden; b) humane rekombinante Prokollagenase 3 oder aktivierte Kollagenase 3 als Standard zur

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

ELISA-Kits zum Nachweis von Kollagenase 3 als Proenzym und in aktivierter Form in Körperflüssigkeiten und Zellkulturüberständen

- 5 Die Erfindung betrifft ELISA-Kits zum Nachweis der von Kollagenase 3 als Proenzym und in aktivierter Form in Körperflüssigkeiten, insbesondere in Serum und Gelenkflüssigkeit des Menschen sowie in Zellkulturüberständen, und monoklonale Antikörper, die Kollagenase 3 in latenter und aktivierter Form spezifisch erkennen. Anwendungsgebiete sind die Medizin und hier besonders die Diagnostik, insbesondere
- 10 die Verlaufsdiagnostik von entzündlichen rheumatischen Erkrankungen (rheumatoide Arthritis), systemischem Lupus Erythematosus (sLE) mit Organbeteiligungen und Gewebeproliferation sowie von Tumorerkrankungen (z.B. Mamma- und colorectale Carcinome).
- 15 Die *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA)-Technik ist gegenwärtiger Technologiestandard in klinischen Labors. Mit dieser Technologie können u.a. Markerproteine für bestimmte Krankheiten in Körperflüssigkeiten von Patienten bestimmt werden.
- 20 Matrix Metalloproteinasen (MMPs) bilden eine Familie aus sezernierten und membrangebundenen Endoproteinasen, die extrazelluläre Matrixproteine hydrolysieren (Nagase, H. and Woessner, F. Jr., J. Biol. Chem. 1999, 274, 21491-21494). Auf der Grundlage ihrer bevorzugten Substrate und struktureller Merkmale kann man MMPs in Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine und Membran-Typ Metalloproteasen einteilen.
- 25 Kollagenase 3 (MMP-13) wird von Zellen als inaktives Proenzym (Prokollagenase 3, Pro-MMP-13) freigesetzt und extrazellulär durch die Abspaltung eines Propeptids in die aktivierte Form überführt.
- 30 Sowohl Prokollagenase 3 als auch die aktivierte Kollagenase 3 sind typischerweise im ausdifferenzierten, adulten Gewebe nicht nachweisbar. Ihr Vorkommen ist jedoch im Zusammenhang mit einer ganzen Reihe von destruktiven Krankheitsbildern beschrieben: Bei der Ausbildung von Brustcarcinomen (Nielsen BS et al., Cancer Res.

2001 61:7091-7100), Rheumatoider Arthritis (Westhoff CS et al., Arthritis Rheum. 1999 42:1517-1527) und Osteoarthrose (Shlopov BV et al. Arthritis Rheum. 1997 40:2065-2074) ist der Gehalt an Prokollagenase 3-mRNA in den betroffenen Gewebetypen stark hochreguliert. Diese Erkenntnisse machen deutlich, dass
5 Kollagenase 3 ein für die medizinische Diagnostik hochinteressantes Markerprotein ist.

Bisher existieren jedoch für keinen Krankheitsverlauf, auch nicht für Rheumatoide Arthritis, Untersuchungen zum tatsächlichen Gehalt von Prokollagenase 3 oder aktivierter Kollagenase 3 in Körperflüssigkeiten wie Serum oder Gelenkflüssigkeit, da
10 bis dato keine zufriedenstellende technologische Lösung auf dem Markt verfügbar war, die solche Messungen erlaubt hätte.

Zur Zeit werden zwei Produkte angeboten, mit denen prinzipiell der Gehalt an Prokollagenase 3 bestimmt werden kann. Beide Tests unterscheiden jedoch nicht
15 zwischen dem Proenzym und der aktivierten Kollagenase 3.

1. Biotrak[®] Matrix Metalloproteinase-13 ELISA system

Der erste Test, das *Biotrak Matrix Metalloproteinase-13 ELISA system*, ist für die Körperflüssigkeiten Serum und Plasma validiert. Das Problem des Testes ist die sehr
20 geringe Sensitivität. Außerdem ist der Test nicht für Untersuchungen von Gelenkflüssigkeit validiert und kann somit für diesen Zweck nicht verwendet werden.

2. Quantikine[®] pro-MMP-13 Immunoassay

Das zweite Testsystem auf dem Markt ist ausschließlich für den Gebrauch in der Zellkultur bestimmt und kann somit nicht für Untersuchungen von Prokollagenase 3 in
25 Körperflüssigkeiten eingesetzt werden.

Der Erfindung lag demzufolge die Aufgabe zugrunde, einen ELISA-Kit zur Verfügung zu stellen, der sich im Gegensatz zu den auf dem Markt befindlichen Tests durch eine
30 hohe Sensitivität auszeichnet und sowohl für den Nachweis der Prokollagenase 3 und der aktivierten Form dieses Enzyms in Körperflüssigkeiten, insbesondere in Serum und Gelenkflüssigkeit des Menschen, als auch in Zellkulturüberständen geeignet ist. Die Erfindung sollte darüber hinaus auch erstmals die Möglichkeit bieten, in

Zellkulturüberständen und Körperflüssigkeiten hochspezifisch das quantitative Verhältnis zwischen latenter und aktivierter Form dieses Enzyms zu bestimmen.

5 Die Erfindung wird gemäß den Ansprüchen realisiert.

Die erfindungsgemäßen ELISA-Kits zum Nachweis von Prokollagenase 3 und aktivierter Kollagenase 3 umfassen in separater Verpackung wenigstens:

- 10 a) einen festen Träger mit daran gebundenen monoklonalen Antikörpern, die sensitiv und spezifisch humane Prokollagenase 3 oder aktivierte Kollagenase 3 binden;
- b) humane rekombinante Prokollagenase 3 oder aktivierte Kollagenase 3 als Standard zur quantitativen Bestimmung dieses Enzyms in Körperflüssigkeiten und Zellkulturüberständen;
- 15 c) einen Puffer zum Herstellen einer Standardreihe der rekombinanten Kollagenase 3;
- d) einen Puffer zum Verdünnen der zu untersuchenden Proben;
- e) ein detektierbar markiertes Konjugat, das an Kollagenase 3 bindet; und
- 20 f) ein Substrat, das die Sichtbarmachung des detektierbar markierten Konjugats erlaubt,

wobei es sich bei den unter a) genannten monoklonalen Antikörpern entweder vorzugsweise um Anti-MMP-13 Klon M34 (Maus) handelt, und besonders bevorzugt um monoklonale Antikörper, die von dem Hybridom mit der Hinterlegungsnummer DSM ACC 2572 gebildet werden, oder vorzugsweise um Anti-MMP-13 Klon EE1
25 (Maus) handelt.

Als detektierbar markiertes Konjugat wird entweder eine Kombination von zwei Komponenten eingesetzt, wobei es sich bei der ersten Komponente um biotinylierte Antikörper handelt, die an Kollagenase 3 binden; und als zweite Komponente um ein
30 hochpolymeres Streptavidin-Konjugat, das an die biotinylierten Antikörper bindet.

Alternativ dazu können auch konjugierte Antikörper eingesetzt werden, die an Kollagenase 3 binden.

Die Antikörper, die als Konjugat fungieren, können monoklonale und/oder polyklonale Antikörper sein.

Humane rekombinante Prokollagenase 3, die in eukaryontischen Zellen (Sf9-Zellen) exprimiert wurde, wird als Standard zur quantitativen Bestimmung der Prokollagenase 3 in Körperflüssigkeiten und Zellkulturüberständen eingesetzt. Sie liegt entweder in Lösung oder in gefriergetrockneter Form vor, in der sie mehrere Monate ohne Qualitätsverlust haltbar ist. Bei Vorliegen in gefriergetrockneter Form muß die rekombinante Prokollagenase 3 vor Benutzung zunächst durch Zugabe von destilliertem Wasser rekonstituiert werden. Humane rekombinante aktivierte Kollagenase 3 wird aus oben genannter Prokollagenase 3 unter Zugabe von Acetamino-phenyl-mercury-acetate (APMA). hergestellt und in gleicher Weise verwendet.

Der für die Verdünnung von zu untersuchenden Proben vorgesehene Puffer enthält neben blockierenden und stabilisierenden Substanzen unter anderem Natriumcitrat. Es zeigte sich überraschenderweise, dass dieses Reagenz für die Vorbereitung von Serum des Menschen zur Messung von Kollagenase 3 besonders gut geeignet ist.

Der Puffer zum Herstellen einer Standardreihe der rekombinanten Prokollagenase 3 oder der aktivierten Kollagenase 3 zur Messung dieser Marker in Serum enthält humanes Serum.

Als feste Träger werden vorzugsweise Mikrotiterplatten verwendet, an welche die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper gebunden sind. Diese Mikrotiterplatten werden so produziert, dass sie mehrere Monate ohne Qualitätsverlust gelagert werden können.

Gegenstand der Erfindung sind auch monoklonale Antikörper, die Kollagenase 3 als Proenzym oder aktiviertes Enzym spezifisch erkennen und binden, wobei diese monoklonalen Antikörper von Hybridomzelllinien mit der Hinterlegungsnummer DSM ACC 2572 produziert werden bzw. Eigenschaften wie die monoklonalen Antikörper aus der Hybridomzelllinie mit der Hinterlegungsnummer DSM ACC 2572 aufweisen.

Zur Erfindung gehören ebenso Antikörper, die Eigenschaften wie die monoklonalen Antikörper aus der Hybridomzelllinien mit der Hinterlegungsnummer DSM ACC 2572 aufweisen, die jedoch biochemisch oder molekularbiologisch verändert oder synthetisch sein können, wobei dem Antikörper ggf. Teile, die für die Erkennung der Prokollagenase 3 nicht notwendig sind, ganz oder teilweise fehlen bzw. diese Teile durch andere ersetzt sind.

Durch die erfindungsgemäßen ELISA-Kits werden der Nachweis von Prokollagenase 3 und von aktivierter Kollagenase 3 in Körperflüssigkeiten, insbesondere in Serum und Gelenkflüssigkeit des Menschen, sowie in Zellkulturüberständen mit hoher Sensitivität ermöglicht und damit dieser potentielle Krankheitsmarker der medizinischen Diagnostik besser zugänglich gemacht.

Im Vergleich zu dem *Biotrak[®] Matrix Metalloproteinase-13 ELISA system* ist die Sensitivität der erfindungsgemäßen ELISA-Kits um den Faktor zehn höher. In Zahlen ausgedrückt liegt die untere Nachweisgrenze der ELISAs bei 4 pg Prokollagenase 3 bzw. bei 6 pg aktivierter Kollagenase 3 / ml Probe.

Die bei der Messung ermittelte Standardkurve durch Untersuchung einer mitgeführten humanen rekombinanten Prokollagenase 3 bzw. der aktivierten Kollagenase 3 erlaubt eine schnelle Berechnung des Kollagenasegehaltes in Proben mit Hilfe der dem Standardverlauf zugrunde liegenden Regressionsfunktion. Ein weiterer entscheidender Vorteil ist, dass die ELISA-Kits im Kühlschrank gelagert werden können, was die Handhabbarkeit und Verbraucherfreundlichkeit wesentlich verbessert.

Die erfindungsgemäßen ELISA-Kits zum Nachweis von Prokollagenase 3 bzw. aktivierter Kollagenase 3 weisen insgesamt für den Endverbraucher eine mindestens einmonatige Haltbarkeit auf. Die Produktion erfolgt nach Standards der EN 46001 und EN ISO 9001. Die ELISA-Kits bieten erstmals die Möglichkeit zur Untersuchung von Gelenkflüssigkeit.

In einer Studie mit Patientenseren wird mit den erfindungsgemäßen ELISA Kits erstmalig gezeigt, dass Kollagenase 3 ein Marker zur Verlaufskontrolle von Rheumatoider Arthritis, aber auch von schweren Fällen mit Organbeteiligung und Gewebeproliferation von systemischem Lupus Erythematosus ist. Eine mit den

erfindungsgemäßen ELISA Kits nachgewiesene Erhöhung des Gehaltes an MMP-13 im Serum geht bei schweren Verlaufsformen von Rheumatoider Arthritis einer akuten klinischen Verschlechterung des Krankheitsbildes voraus. Das Enzym ist nicht zu jeder Zeit im Serum nachweisbar, daher ist dieser Marker vorrangig für die

5 Verlaufsprognostik ausgewählter Erkrankungen geeignet, insbesondere für einen präventiven Therapiebeginn, bevor sich beim Patienten Beschwerden klinisch bemerkbar machen

Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung von Kollagenase 3

- 10 - als serologischer Marker für die Diagnostik und insbesondere die Verlaufskontrolle von entzündlichen rheumatischen Erkrankungen, insbesondere von Rheumatoider Arthritis und
- als serologischer Marker für die Diagnostik und insbesondere die Verlaufskontrolle von systemischem Lupus Erythematosus, insbesondere zur Verlaufsprognose bei
- 15 gleichzeitiger Gewebeproliferation (Tumorbildung).

Kollagenase 3 kann weiterhin auch als serologischer Marker für die Diagnostik und Verlaufskontrolle anderer Tumor-Erkrankungen, insbesondere von Mamma-Carcinomen und Colorectalcarcinomen verwendet werden.

- 20 Auch für die Diagnostik und Verlaufskontrolle weiterer Erkrankungen, bei denen eine Erhöhung von Kollagenase 3 beschrieben ist, kann Kollagenase 3 als serologischer Marker eingesetzt werden.

Die Erfindung soll nachstehend durch Beispiele und Abbildungen näher erläutert werden.

Beispiel 1: Herstellung und Screening der monoklonalen Antikörper

5

Zur Immunisierung wurden Mäuse verwendet. Als Antigen diente humane rekombinante Prokollagenase 3, die in Sf9-Zellen exprimiert wurde. Das Antigen wurde folgendermaßen vorbereitet: 50 µg MMP-13 in 100 µl PBS + 100 µl 6M Harnstoff wurden vorgelegt. Zu dieser Lösung wurden 100 µl CFA oder IFA gegeben.

10 Die Injektion wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

Tag 0: 50 µg MMP-13 intraperitoneal in CFA

Tag 13: 50 µg intraperitoneal in IFA

Tag 41: 50 µg intravenös in 1 ml PBS

Tag 44: Hybridisierung von Pre-Lymphozyten mit Milz- und SP 2/0 Myelomzellen.

15

Es wurden drei Hybridisierungen aus ein und derselben Milz mit verschiedenen Lymphozytenmengen durchgeführt. Die dritte Hybridisierung war erfolgreich.

Überstände der ausgewachsenen Hybridome wurden im ELISA getestet. Dazu wurden 100 µl rekombinante humane Prokollagenase 3 (1 µg/ml in PBS) in den Näpfen einer

20 Titerplatte über Nacht bei 4 °C immobilisiert und nach 3 Wasch-Schritten (PBS mit 0,05 % Tween® 20) mit einem Blockierungspuffer (1 % BSA in PBS) zwei Stunden blockiert. Jeweils 50 µl der Zellkulturüberstände sowie Positiv- und Negativkontrollen wurden für eine Stunde (37 °C) in die Näpfe gegeben. Nach dieser Inkubation wurde die Platte dreimal gewaschen und für eine weitere Stunde (37 °C) 100 µl Anti-Maus

25 IgG(H+L)-POD-Konjugat zugegeben. Nach weiteren fünf Waschungen wurde der POD-Gehalt in den Näpfen mit je 100 µl TMB Substrat (20 min, RT) detektiert. Die Reaktion wurde mit 50 µl 2 M H₂SO₄ gestoppt und die Absorption bei 450 nm gemessen.

Die im ELISA positiven Hybridomüberstände wurden bis zur Monoklonalität kloniert

30 und rekloniert. Es wurden 5 unabhängige monoklonale Antikörper erhalten, aus denen insgesamt 12 Subklone mit teilweise veränderten Affinitäten gewonnen wurden. Eine Hybridomzelllinie, die die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper Anti-MMP-13 Klon M34 (Maus) produziert (IgG1), wurde bei der Deutschen Sammlung von

Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSM ACC 2572Z) in Braunschweig unter der Nummer DSM ACC 2572 am 27. 08. 02 hinterlegt.

Beispiel 2: Durchführung der ELISAs

5

Das Prinzip der ELISAs ist in Abbildung 1 dargestellt. Zur Durchführung der ELISAs wird aus der humanen rekombinanten Kollagenase 3 eine Verdünnungsreihe als Standard erstellt, welche die rekombinante Prokollagenase 3 (bzw. aktivierte Kollagenase 3) in folgenden Konzentrationen enthält: 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 63 pg/ml, 32 pg/ml, 16 pg/ml, 0 pg/ml (Start der Verdünnungsreihe zur Bestimmung aktivierter Kollagenase 3: 2000 pg/ml). Wenn der Kollagenase 3 Gehalt in Serum bestimmt werden soll, wird die Standardverdünnung mit einem speziellen Puffersystem hergestellt, das 10 % humanes Serum enthält. Jeweils 100 µl dieser Standardverdünnungen werden in Doppelbestimmung in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte, an die monoklonale Antikörper aus der Hybridomzelllinie mit der Hinterlegungsnummer DSM ACC 2572 gebunden sind, pipettiert. Die zu messenden Proben (Zellkulturmedium, Gelenkflüssigkeit oder Serum) werden mit dem für die Probenvorbereitung vorgesehenen Puffer verdünnt. Von den verdünnten Proben werden dann ebenfalls jeweils 100 µl in Doppelbestimmung aufgetragen.

20 Nach 120 Minuten Inkubation auf einem Schüttler bei Raumtemperatur wird die Mikrotiterplatte mit dem Waschpuffer vier Mal gewaschen und danach durch Ausschlagen auf Papierhandtüchern die verbliebene Flüssigkeit entfernt. Es folgt der Eintrag von jeweils 100 µl Detektionslösung 1, die biotinylierte Antikörper enthält, in alle benutzten Wells der Mikrotiterplatte. Hierbei handelt es sich entweder um

25 polyklonale Antikörper oder aber um einen monoklonalen Antikörper oder einen Cocktail aus mehreren monoklonalen Antikörpern. Nach weiteren 90 Minuten Inkubation wird die Mikrotiterplatte wiederum vier Mal gewaschen und auf einem Papiertuch ausgeschlagen. Die Detektionslösung 2, bestehend aus einem Streptavidin-Peroxidasekonjugat und einem Verdünnungspuffer, wird gemäß Anweisung hergestellt

30 und wiederum jeweils 100 µl in die entsprechenden Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert. Es folgt eine weitere Inkubation von 30 Minuten. Danach wird die Mikrotiterplatte fünf Mal gewaschen und ausgeschlagen, mit 100 µl pro Vertiefung Substratlösung (Tetramethylbenzidin) versehen und im Dunkeln für 15 Minuten inkubiert. Nach Ablauf der Zeit werden 100 µl Stopplösung (0,5 M Schwefelsäure) den

Vertiefungen zugesetzt und die Mikrotiterplatte bei 450 nm in einem Mikrotiterplattenreader gemessen. Die Intensität der optischen Dichte entspricht dem Gehalt an Kollagenase 3.

5 Beispiel 3: Untersuchung von Körperflüssigkeiten mit dem ELISA-Kit

Es wurde eine größere Anzahl von Patientenseren mit unterschiedlichen Erkrankungsbildern mithilfe der ELISA-Kits gemessen.

Tabelle 1: Messung von Pro-MMP-13 und aktivierter MMP-13 mit den beiden

- 10 InviLISA MMP-13 Kits. Die Tabelle gibt die Größe des Probenkollektivs sowie die Anzahl der positiven Proben (in den jeweiligen Tests und insgesamt) an. RA = Rheumatoide Arthritis; pSS = primäres Sjögren Syndrom; sLE = systemischer Lupus Erythematosus.

Erkrankung	Kollektiv (n)	Pro MMP-13	Act MMP-13	gesamt pos
RA	145	7	22	20 %
pSS	50	0	0	0 %
sLE	40	0	1	3 %
Myositis	33	0	1	3 %
Sklerodermie	15	0	0	0 %
Vaskulitis	21	0	0	0 %
Fibromyalgie	15	0	0	0 %
Blutspender	160	3	1	2 %

Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse dieser Messungen: Während in einem Kontrollkollektiv von Blutspendern nur etwa 2 % positiv in den Tests reagierten, zeigten 20 % der Seren von Patienten mit Rheumatoider Arthritis positive Signale.

5 Seren von Patienten mit anderen Erkrankungen (systemischer Lupus Erythematosus, Myositis, Sklerodermie, Vaskulitis, Fibromyalgie) waren mit dem Kontrollkollektiv vergleichbar. Es wurden außerdem Serumproben von Patienten mit Rheumatoider Arthritis gemessen, die im Verlauf von zwei bis drei Jahren erhoben worden waren. Es sind exemplarisch zwei Verläufe dargestellt (Abb. 2 und 3). Abb. 2 zeigt deutlich erhöhte aktive MMP-13 Werte unmittelbar vor Einsetzen einer klinischen
10 Verschlechterung, die mit einem massiven Anschwellen des rechten Kniegelenkes einhergeht. Der langsam einsetzenden klinischen Besserung folgt ein Absinken des MMP-13 Titers.

Abb. 3 zeigt ebenso wie Abb. 2 die besondere Eignung der aktivierten Kollagenase 3 als Verlaufsmarker für Rheumatoide Arthritis. In den ersten sechs Monaten des
15 Untersuchungszeitraumes sind die gemessenen MMP-13 Werte nicht erhöht bzw. liegen unterhalb des definierten Cut-Off von 300 pg/ml MMP-13. Der betreffende Patient wurde im November 1998 geröntgt, wobei die Handgelenke als Grad 1 nach Larsen klassifiziert wurden. Im Dezember 1998 erlitt der Patient einen massiven Schub, der mit gemessenen stark erhöhten MMP-13 Werten einherging. Im Juni 1999 belegten
20 Kontroll-Röntgenaufnahmen eine progrediente Destruktion der Handgelenke (Larsen Grad 2) sowie eine beginnende Destruktion der Fußgelenke (Larsen Grad 1).

Als Kontrolle wurden Verlaufsmessungen in Seren von Patienten mit Sjögren Syndrom durchgeführt. Diese zeigten zu keinem Zeitpunkt erhöhte MMP-13 Werte. (Daten nicht gezeigt).

25 In Abb. 4 sind zwei exemplarische Verlaufsmessungen von Patienten mit systemischem Lupus Erythematosus (sLE) dargestellt. Während selbst Seren von Patienten mit schweren Krankheitsverläufen keine oder nur marginal erhöhte MMP-13 Werte aufwiesen (Abb. 4 A, sLE mit renaler Beteiligung, sehr schwere Symptomatik), zeigten Seren von sLE-Patienten mit Gewebeproliferation erhöhte Werte an aktivierter MMP-
30 13 (Abb. 4 B, sLE mit renaler Beteiligung, membran-proliferierende Glomerulo-Nephritis Typ IV a, schwere Symptomatik). Diese Messungen weisen darauf hin, dass MMP-13 ein Indikator für Tumorwachstum sein kann.

Legende zu den Abbildungen

Abbildung 1: Prinzip des Nachweisverfahrens

- 5 **Schritt 1:** Inkubation von Standards oder Proben auf der Titerplatte. Spezifische Bindung von Kollagenase 3 (MMP-13) als Proenzym oder in aktivierter Form (Dauer: 120 Minuten)
- Schritt 2:** Detektion der gebundenen Kollagenase 3 (MMP-13) mit biotinyliertem Antikörper (Dauer: 90 Minuten)
- 10 **Schritt 3:** Zugabe von Streptavidin-Peroxidase-Konjugat (Dauer: 30 Minuten)
- Schritt 4:** Farbentwicklung nach Zugabe von TMB-Substrat (Dauer: 15 Minuten)

Abbildung 2: Messung von aktiverter MMP-13 im Serum eines Patienten mit Rheumatoider Arthritis (Larsen III, DAS-Score > 3,8).

- 15 In den Proben waren keine erhöhten Pro-MMP-13 Werte nachweisbar. Deutlich ist die Erhöhung der MMP-13 Werte im Serum unmittelbar zum Zeitpunkt eines Schubes sowie das anschließende Absinken der Werte während der Remission (Pfeile).

Abbildung 3: Messung von Pro-MMP-13 (schwarze Balken) und aktivierter MMP-13 (graue Balken) im Serum eines Patienten mit Rheumatoider Arthritis.

- 20 Erläuterungen im Text. RA = Rheumatoide Arthritis; St. = Stadium; HG = Handgelenk, FG = Fußgelenk.

Abbildung 4: Messung von Pro-MMP-13 (schwarze Balken) bzw. aktivierter MMP-13 (graue Balken) in Serum von zwei Patienten mit sLE.

- 25 A: sLE-Patient mit renaler Beteiligung, nephrotisches Syndrom, sehr schwere Symptomatik. B: sLE-Patient mit renaler Beteiligung, schwere Symptomatik, proliferierende Glomerulo-Nephritis Typ IV a. Erläuterungen im Text.

Patentansprüche

1. ELISA-Kit zum Nachweis von Prokollagenase 3 bzw. aktivierte Kollagenase 3 in Körperflüssigkeiten, insbesondere in Serum und Gelenkflüssigkeit des Menschen,
5 sowie in Zellkulturüberständen, umfassend in separater Verpackung wenigstens:
 - a) einen festen Träger mit daran gebundenen monoklonalen Antikörpern, die sensitiv und spezifisch humane Prokollagenase 3 bzw. aktivierte Kollagenase 3 binden;
 - b) humane rekombinante Prokollagenase 3 bzw. aktivierte Kollagenase
10 3 als Standard zur quantitativen Bestimmung dieses Enzyms in Körperflüssigkeiten;
 - c) einen Puffer zum Herstellen einer Standardreihe der rekombinanten Prokollagenase 3 bzw. aktivierten Kollagenase 3;
 - d) einen Puffer zum Verdünnen der zu untersuchenden Probe;
 - 15 e) ein detektierbar markiertes Konjugat, das an Kollagenase 3 bindet;
 - f) und ein Substrat, das die Sichtbarmachung des detektierbar markierten Konjugats erlaubt.
2. ELISA-Kit nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass
20 es sich bei den monoklonalen Antikörpern, die an den festen Träger gebunden sind, vorzugsweise um monoklonale Antikörper handelt, die von dem Hybridom mit der Hinterlegungsnummer DSM ACC 2572 gebildet werden.
3. ELISA-Kit nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, dass
25 als detektierbar markiertes Konjugat eine Kombination von zwei Komponenten eingesetzt wird, wobei es sich bei der ersten Komponente um einen biotinylierten Antikörper handelt, der an Prokollagenase 3 bzw. an aktivierte Kollagenase 3 bindet; und als zweite Komponente ein hochpolymeres Streptavidin-Konjugat eingesetzt wird, das an die biotinylierten Antikörper bindet.
30
4. ELISA-Kit nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, dass
als detektierbar markiertes Konjugat ein konjugierter Antikörper eingesetzt wird, der an Kollagenase 3 bindet.

5. ELISA-Kit nach Anspruch 1, 2 und 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Antikörper, die als Konjugat fungieren, monoklonale und/oder polyklonale Antikörper sind.

5 6. ELISA-Kit nach Anspruch 1-5, dadurch gekennzeichnet, dass die als Konjugate eingesetzten Substanzen mit allen üblichen Substanzen konjugiert werden können, vorzugsweise mit:

- Meerrettichperoxidase
- alkalischer Phosphatase.

10

7. ELISA-Kit nach Anspruch 1-6, dadurch gekennzeichnet, dass die als Standard eingesetzte humane rekombinante Kollagenase 3 in eukaryontischen Zellen exprimiert wurde und in Lösung oder lyophilisiert vorliegt.

15 8. ELISA-Kit nach Anspruch 1-7, dadurch gekennzeichnet, dass der Puffer zum Verdünnen der zu untersuchenden Körperflüssigkeiten und Zellkulturüberstände Natriumcitrat enthält.

9. ELISA-Kit nach Anspruch 1-8, dadurch gekennzeichnet, dass
20 als feste Träger Mikrotiterplatten oder gängige Proteinchip-Technologien eingesetzt werden.

10. Monoklonale Antikörper, die Prokollagenase 3 spezifisch erkennen und binden, wobei diese monoklonalen Antikörper Eigenschaften wie die monoklonalen Antikörper aus
25 der Hybridomzelllinie mit der Hinterlegungsnummer DSM ACC 2572 aufweisen.

11. Monoklonale Antikörper nach Anspruch 10, wobei die monoklonalen Antikörper biochemisch oder molekularbiologisch verändert oder synthetisch sein können, wobei den Antikörpern ggf. Teile, die für die Erkennung der Prokollagenase 3 nicht
30 notwendig sind, ganz oder teilweise fehlen bzw. diese Teile durch andere ersetzt sind.

12. Monoklonale Antikörper nach Anspruch 10-11, die von der Hybridomzelllinie mit der Hinterlegungsnummer DSM ACC 2572 produziert werden.

13. Hybridomzelllinie mit der Hinterlegungsnummer DSM ACC 2572

14. Monoklonale Antikörper, die aktivierte Kollagenase 3 spezifisch und sensitiv erkennen und binden, wobei diese Antikörper keine Affinität zu Prokollagenase aufweisen

5

15. Monoklonale Antikörper nach Anspruch 10, wobei die monoklonalen Antikörper biochemisch oder molekularbiologisch verändert oder synthetisch sein können, wobei den Antikörpern ggf. Teile, die für die Erkennung der aktivierten Kollagenase 3 nicht notwendig sind, ganz oder teilweise fehlen bzw. diese Teile durch andere ersetzt sind.

10

16. Verwendung von Kollagenase 3 als serologischen Marker für die Diagnostik und insbesondere die Verlaufskontrolle von entzündlichen rheumatischen Erkrankungen, insbesondere von Rheumatoider Arthritis.

15

17. Verwendung von Kollagenase 3 als serologischer Marker für die Diagnostik und insbesondere die Verlaufskontrolle von systemischem Lupus Erythematosus, insbesondere zur Verlaufsprognose bei gleichzeitiger Gewebeproliferation (Tumorbildung).

20

18. Verwendung von Kollagenase 3 als serologischer Marker für die Diagnostik und Verlaufskontrolle anderer Tumor-Erkrankungen, insbesondere von Mamma-Carcinomen und Colorectalcarcinomen.

25

19. Verwendung von Kollagenase 3 als serologischer Marker für die Diagnostik und Verlaufskontrolle weiterer Erkrankungen, bei denen in der wissenschaftlichen Literatur eine Erhöhung von Kollagenase 3 beschrieben ist.

Abbildung 1

1 / 4

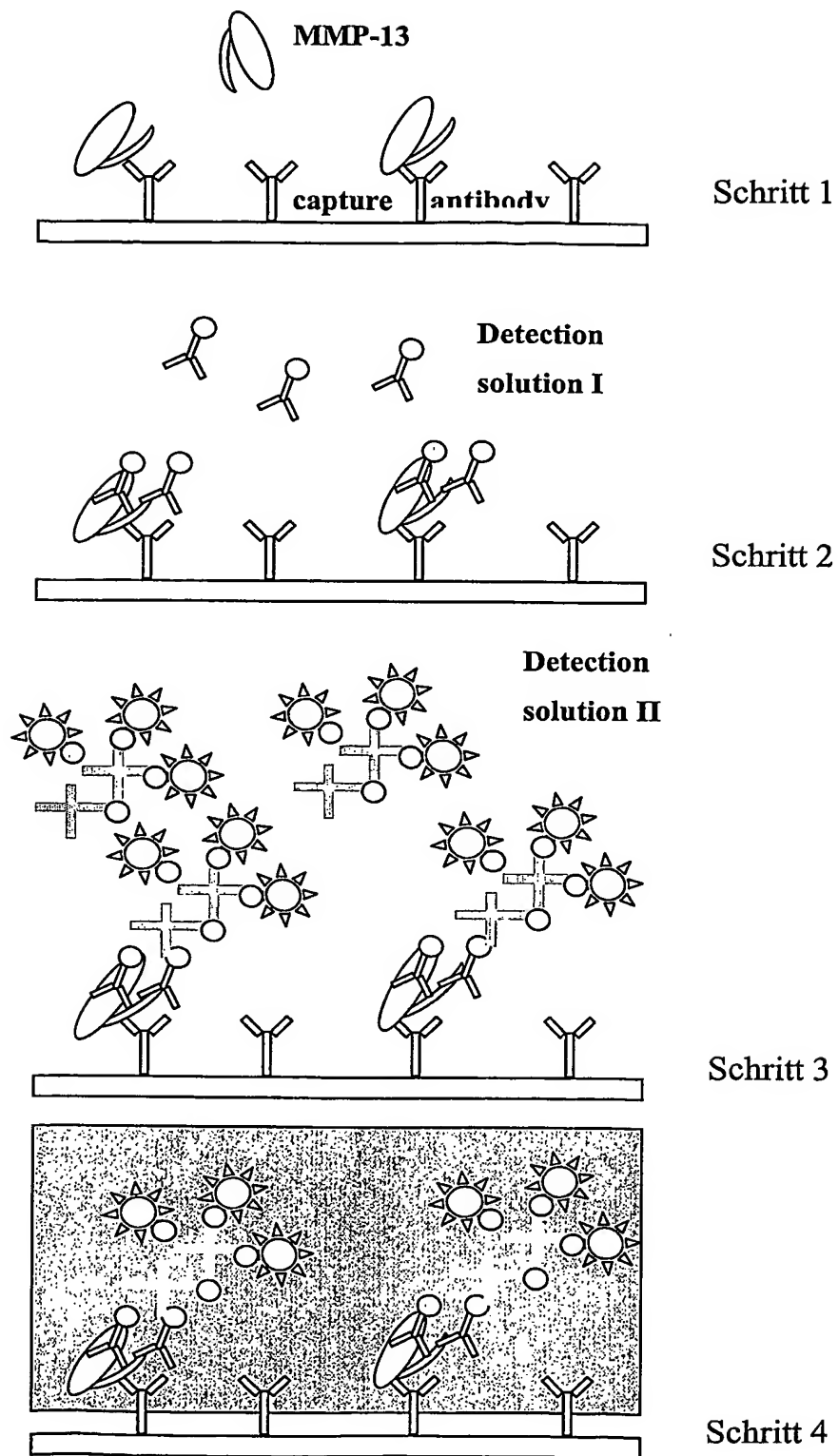


Abbildung 2

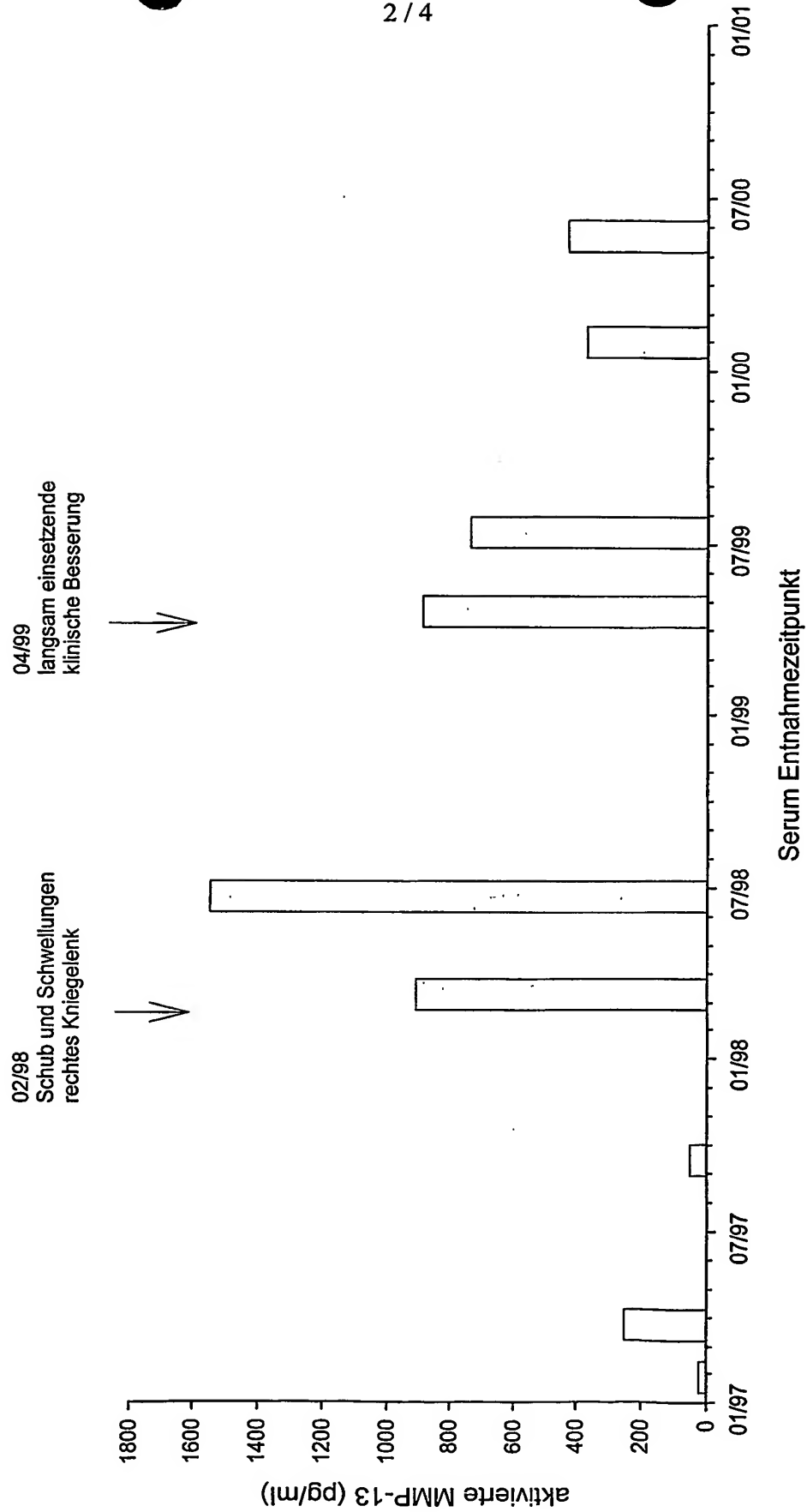


Abbildung 3

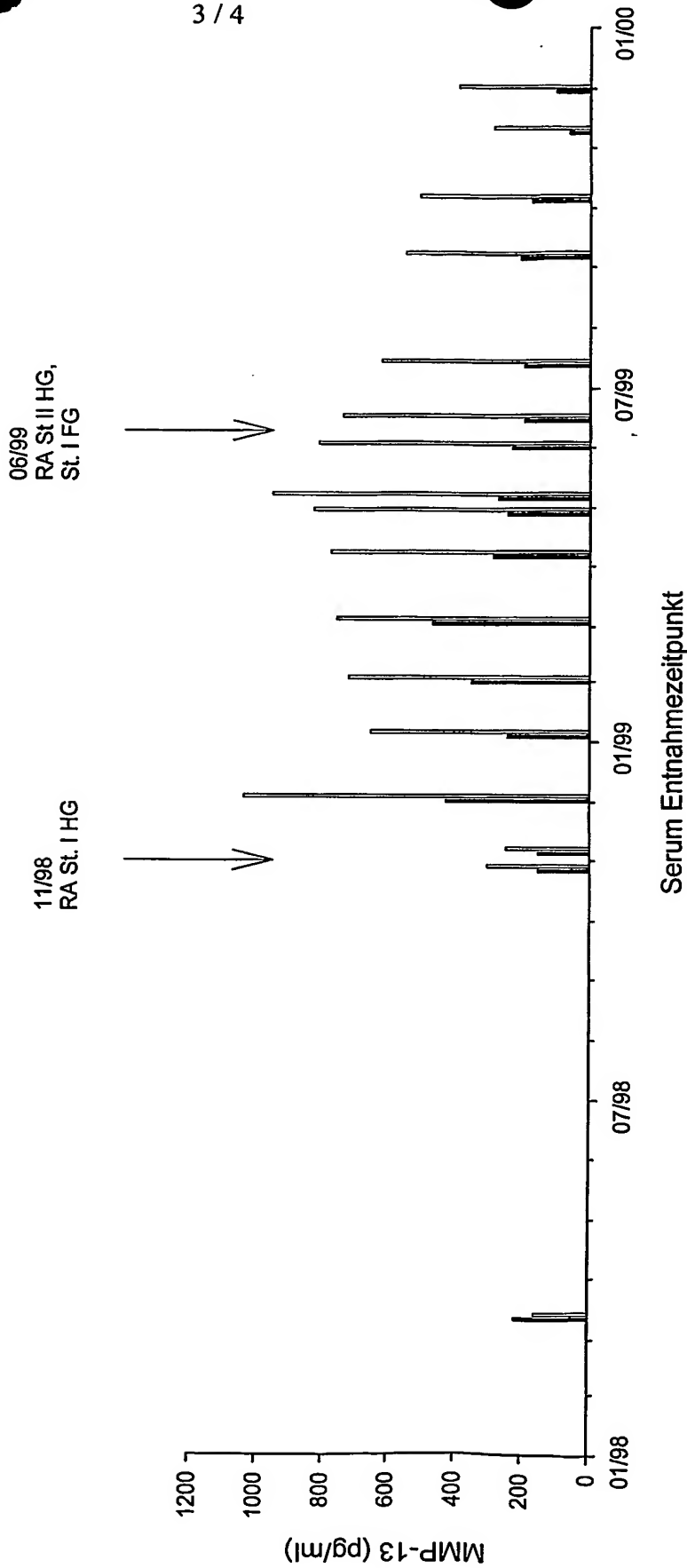
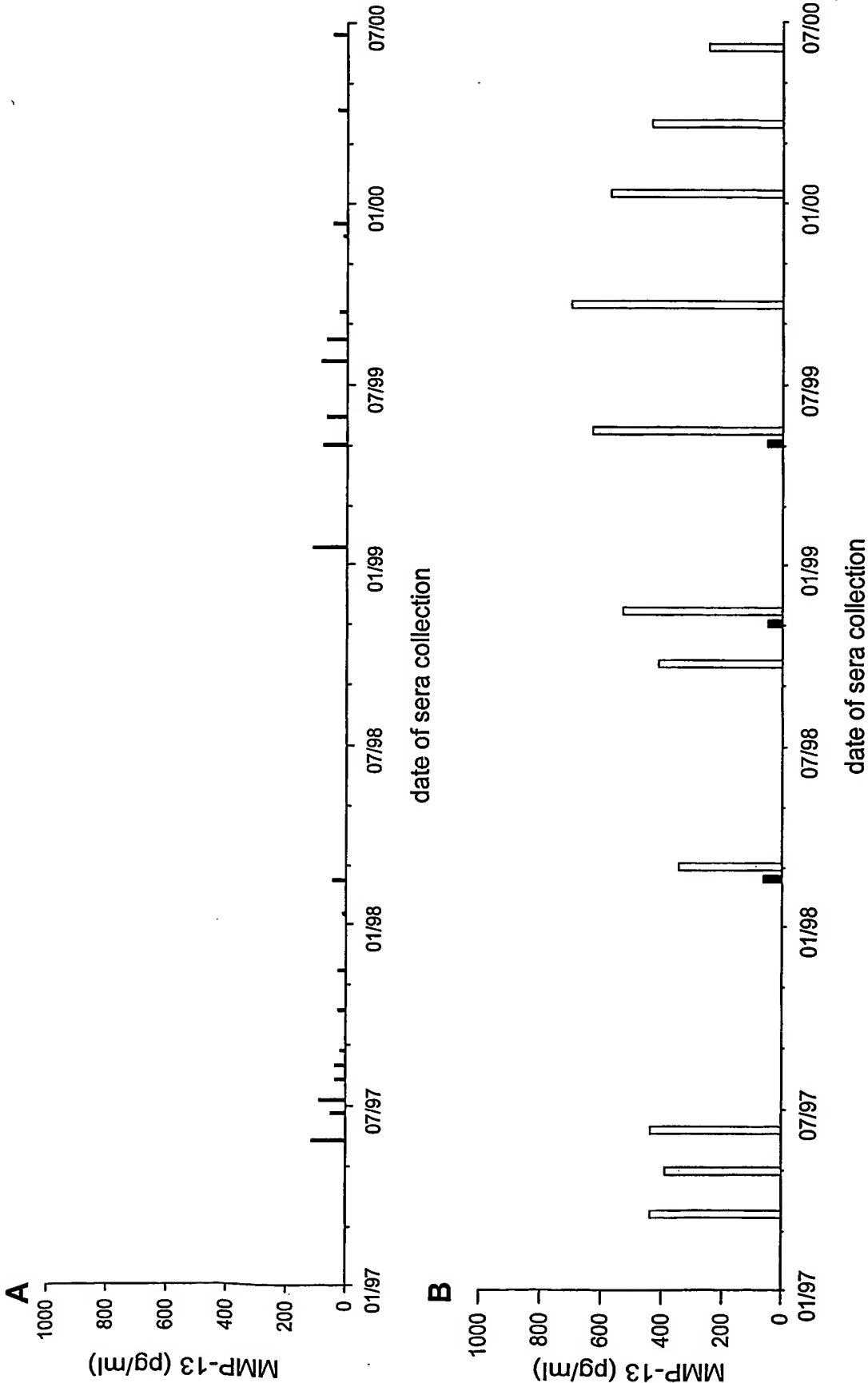


Abbildung 4



INTERNATIONALES FORMBLATT

Invitek


Gesellschaft für Biotechnik

& Biodesign mbH

Robert-Rössle-Str. 10

13125 Berlin

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen: Anti-human-collagenase 3 M34	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM ACC2572
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde <input checked="" type="checkbox"/> eine wissenschaftliche Beschreibung <input type="checkbox"/> eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen).	
III. EINGANG UND ANNAHME	
Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 2002-08-27 (Datum der Erst- hinterlegung) ¹ eingegangen ist.	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am _____ eingegangen (Datum der Erst- hinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapester Vertrag ist am _____ eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  Datum: 2002-09-03

¹ Falls Regel 6:4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG
ausgestellt gemäß Regel 10.2 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

1 Angabe des Datums der Erstunterlegung. Wenn eine erneute Hinterlegung oder eine Weiterleitung vorgenommen worden ist, Angabe des Datums der
2 jeweils letzten erneuten Hinterlegung oder Weiterleitung.
3 In den in Regel 10.2 Buchstabe a Ziffer ii und iii vorgesehenen Fällen Angabe der letzten Lebensfähigkeitsprüfung.
4 Zutreffendes ankreuzen.
Ausfüllen, wenn die Angaben beantragt worden sind und wenn die Ergebnisse der Prüfung negativ waren.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 03/02864

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N33/573

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, PAJ, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6 280 687 B1 (TIKANOJA SARI HANNELE ET AL) 28 August 2001 (2001-08-28) Sp. 12, Zeilen 28 - 34, Sp. 15, Zeile 8 - Sp. 16, Zeile 10, Sp. 19, Zeilen 7 - 41, Sp. 19, Zeile 61 - Sp. 20, Zeile 24 ---	10-14, 19
X	WO 00 63698 A (SEPPER RUTH ;PRIKK KAIU (EE); RAULO SAARA (FI); TIKANOJA SARI (FI)) 26 October 2000 (2000-10-26) Ansprüche 1, 3, 7 - 11, 16 ---	10-15, 19
X	WO 98 29560 A (LOPEZ OTIN CARLOS ;FUJI YAKUHIN KOGYO KK (JP); YOSHIDA SHIN ICHI) 9 July 1998 (1998-07-09) abstract --- -/--	1-15

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 January 2004

Date of mailing of the international search report

02/02/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hoesel, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 03/02864

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00 58502 A (GROMNICA IHLE ERIKA ;MAX DELBRUECK CENTRUM (DE); WERNICKE DIRK (DE) 5 October 2000 (2000-10-05) page 3, line 27 -page 5, line 25 ---	16
X	SELVAMURUGAN N PARTRIDGE N C: "Constitutive expression and regulation of collagenase-3 in human breast cancer cells" MOLECULAR CELL BIOLOGY RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA,, US, vol. 3, no. 4, 2000, pages 218-223, XP002957630 ISSN: 1522-4724 abstract -----	18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP 03/02864

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See supplemental sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

The International Searching Authority has determined that this international application contains more than one invention or group of inventions, namely:

1. claims 1-13

ELISA kit and selected antibody which binds specifically to collagenase 3 (mmp-13) and procollagenase 3;

2. claims 14, 15

antibody which binds specifically to collagenase 3 but has no affinity for procollagenase 3;

3. claim 16

use of collagenase 3 as diagnostic marker for inflammatory rheumatic diseases;

4. claim 17

use of collagenase 3 as diagnostic marker for lupus erythematosus;

5. claim 18

use of collagenase 3 as diagnostic marker for lupus erythematosus;

6. claim 18

use of collagenase 3 as diagnostic marker for tumour diseases;

7. claim 19

use of collagenase 3 as diagnostic marker for further mmp-13-associated diseases.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 03/02864

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6280687	B1	28-08-2001	US 6143506 A	07-11-2000
WO 0063698	A	26-10-2000	AU 4121900 A	02-11-2000
			CA 2370418 A1	26-10-2000
			EP 1171770 A1	16-01-2002
			WO 0063698 A1	26-10-2000
			JP 2002542485 T	10-12-2002
WO 9829560	A	09-07-1998	WO 9829560 A1	09-07-1998
WO 0058502	A	05-10-2000	DE 19913428 A1	28-09-2000
			WO 0058502 A2	05-10-2000

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationale Patentzeichen

PCT/DE 03/02864

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 7 G01N33/573

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 IPK 7 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, PAJ, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 6 280 687 B1 (TIKANOJA SARI HANNELE ET AL) 28. August 2001 (2001-08-28) Sp. 12, Zeilen 28 - 34, Sp. 15, Zeile 8 - Sp. 16, Zeile 10, Sp. 19, Zeilen 7 - 41, Sp. 19, Zeile 61 - Sp. 20, Zeile 24 ----	10-14, 19
X	WO 00 63698 A (SEPPER RUTH ;PRIKK KAIU (EE); RAULO SAARA (FI); TIKANOJA SARI (FI)) 26. Oktober 2000 (2000-10-26) Ansprüche 1, 3, 7 - 11, 16 ----	10-15, 19
X	WO 98 29560 A (LOPEZ OTIN CARLOS ;FUJI YAKUHIN KOGYO KK (JP); YOSHIDA SHIN ICHI () 9. Juli 1998 (1998-07-09) Zusammenfassung ----- -/--	1-15



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

16. Januar 2004

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

02/02/2004

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hoesel, H

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 00 58502 A (GROMNICA IHLE ERIKA ;MAX DELBRUECK CENTRUM (DE); WERNICKE DIRK (DE) 5. Oktober 2000 (2000-10-05) Seite 3, Zeile 27 -Seite 5, Zeile 25 -----	16
X	SELVAMURUGAN N PARTRIDGE N C: "Constitutive expression and regulation of collagenase-3 in human breast cancer cells" MOLECULAR CELL BIOLOGY RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA,, US, Bd. 3, Nr. 4, 2000, Seiten 218-223, XP002957630 ISSN: 1522-4724 Zusammenfassung -----	18

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☒ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1 - 13

ELISA Kit und ausgewählter Antikörper, der spezifisch an Kollagenase 3 (mmp-13) und Prokollagenase 3 bindet

2. Ansprüche: 14, 15

Antikörper, der spezifisch an Kollagenase 3 bindet, aber keine Affinität zu Prokollagenase 3 aufweist

3. Anspruch : 16

Verwendung von Kollagenase 3 as diagnostischer Marker für entzündliche rheumatische Erkrankungen

4. Anspruch : 17

Verwendung von Kollagenase 3 as diagnostischer Marker für Lupus Erythematosus

5. Anspruch : 18

Verwendung von Kollagenase 3 as diagnostischer Marker für Lupus Erythematosus

6. Anspruch : 18

Verwendung von Kollagenase 3 as diagnostischer Marker für Tumorerkrankungen

7. Anspruch : 19

Verwendung von Kollagenase 3 as diagnostischer Marker für weitere mmp-13 assoziierte Erkrankungen

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
US 6280687	B1	28-08-2001	US	6143506 A	07-11-2000
WO 0063698	A	26-10-2000	AU	4121900 A	02-11-2000
			CA	2370418 A1	26-10-2000
			EP	1171770 A1	16-01-2002
			WO	0063698 A1	26-10-2000
			JP	2002542485 T	10-12-2002
WO 9829560	A	09-07-1998	WO	9829560 A1	09-07-1998
WO 0058502	A	05-10-2000	DE	19913428 A1	28-09-2000
			WO	0058502 A2	05-10-2000